

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan metode yang digunakan adalah metode difusi cakram.

#### **4.2 Lokasi Penelitian**

Penelitian terkait pembuatan fraksi dan penggolongan senyawa uji dilakukan di Laboratorium Sintesis dan laboratorium Formulasi Sediaan UMM. Penelitian terkait Uji Aktivitas Antijamur dilakukan di laboratorium Biomedik pada bulan April - Juni 2019.

#### **4.3 Instrumen Penelitian**

Adapun instrumen dalam penelitian ini, meliputi antara lain :

##### **4.3.1 Alat Pembuatan Serbuk Simplisia**

1. Oven BINDER
2. Mesin penggiling (Blender)
3. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
4. Pengayak mesh 40 dan 60

##### **4.3.2 Alat Proses Ekstraksi**

1. Timbangan analitik balance *Scout Pro 400 g*
2. Gelas piala 1000 ml *Pyrex Iwaki TE\_32*
3. Gelas ukur
4. Desikator
5. Penyaring Buchner 100 mm
6. Cawan Porselen Ø 10 cm
7. Batang pengaduk
8. Sudip besi 20 cm
9. Oven BINDER
10. Pipet tetes

11. Erlenmeyer 1000 ml
12. *Rotary evaporator vacuum Buchi R-215*

#### 4.3.3 Alat Pengujian Difusi Cakram

1. Inkubator
2. Autoklaf
3. Micro pipet
4. Laminar Air Flow
5. Tabung reaksi
6. *Hot plate*
7. Bunsen
8. Pipet volume
9. Kertas saring
10. Erlenmeyer
11. Penjepit
12. *Yellow tip*
13. *Blue tip*
14. *Eppendrop*
15. Cawan petri
16. Kawat ose

#### 4.4 Bahan Penelitian

Adapun bahan penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

##### 4.4.1 Bahan Uji

Bahan tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi *E. palmifolia* L. yang didapatkan dari daerah kota Palangka Raya dan telah diserbukkan oleh UPT. Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan, Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel umbi *E. palmifolia* L. dengan warna merah keunguan dan ukuran panjang 5 cm dan diameter 3 cm.

Mikroba uji adalah *C.albicans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 4.4.2 Determinasi Tanaman

Sampel umbi *E. palmifolia* L. diidentifikasi di UPT Materia Medika Batu (lampiran 2).

#### 4.4.3 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Proses penelitian kali ini dilakukan dengan fraksinasi bertingkat, yang dimulai dengan pelarut n-Heksana (non-polar), etil asetat (semi polar) dan etanol (polar). Dalam pembuatan ekstraknya serbuk umbi *E. palmifolia* diekstraksi menggunakan maserasi perendaman selama 24 jam. Pada proses fraksinasi, serbuk ditimbang sebanyak 2 kilogram dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian ditambah pelarut n-Heksana sebanyak 20 liter dengan perbandingan 1:10 dan direndam selama 24 jam, disaring dengan corong Buchner, didapat filtrat 1 dan residu 1. Di maserasi kembali dengan pelarut n-Heksana sebanyak 10 liter dengan perbandingan 1:5 dan direndam selama 24 jam, disaring dengan corong Buchner, didapat filtrat 2 dan residu 2. Proses remaserasi dilakukan sebanyak 3 kali hingga didapatkan 4 filtrat. Filtrat yang telah dikumpulkan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45°C sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian dipindahkan kedalam cawan porselen. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C dan disimpan pada lemari pendingin. Didapat fraksi n-Heksana. Residu dikeringkan hingga pelarut n-Heksana menguap, kemudian ditambahkan pelarut etil asetat dan dilanjutkan dengan pelarut etanol dengan cara yang sama.

#### 4.4.4 Pengujian Difusi Cakram

1. Fraksi n-Heksana umbi *E. palmifolia* (L).
2. *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (Oxioo)
3. *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) (Oxioo)
4. Aqudest steril (Merck)
5. *Nystatin* 50µg sebagai Kontrol positif
6. Tween 10% (Merck)

#### 4.4.5 Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. N-Heksana teknis (Bratachem)
2. Etil asetat teknis (Bratachem)
3. Asam sulfat 10% (Merck)
4. Larutan KOH 10% (Merck)
5.  $\text{FeCl}_3$  1% (Merck)
6. NaCl 10% (Merck)
7. Reagen Dragendorff (Merck)
8. Reagen anisaldehyda-asam sulfat (Merck)
9. Lempeng KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> (KGaA)
10. Asam formiat pro analisis (KGaA)

#### 4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah fraksi n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. dengan konsentrasi 80 mg/ml, 120 mg/ml, dan 160 mg/ml.

##### 4.5.2 Variabel Terikat

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jamur *C.albicans* dengan melihat zona jernih disekitar cakram pada media agar sebagai parameter untuk menentukan zona hambat minimal dari efek antijamur fraksi n-Heksana umbi *E. palmifolia* L.

#### 4.6 Sterilisasi

Semua alat yang digunakan, terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi, yaitu cara sterilisasi kering dan cara sterilisasi basah.

##### 4.6.1 Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas :

1. Sterilisasi dengan api langsung

Sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum Ose, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk.

2. Sterilisasi dengan oven pemanas

Oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan kedalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam

#### 4.6.2 Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya gelas ukur, erlenmeyer dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15-20 menit (Hafsan et.al., 2015).

Media pertumbuhan jamur yakni *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) juga disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 4.7 Metode Penelitian

Adapun metode penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

##### 4.7.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mendapatkan data diameter daya hambat senyawa dalam fraksi n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. terhadap pertumbuhan jamur *C.albicans* serta mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. secara *in vitro* dengan metode difusi cakram.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan yakni kelompok uji yaitu fraksi n-Heksana dan kelompok kontrol yaitu *Ketokonazol*. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu:

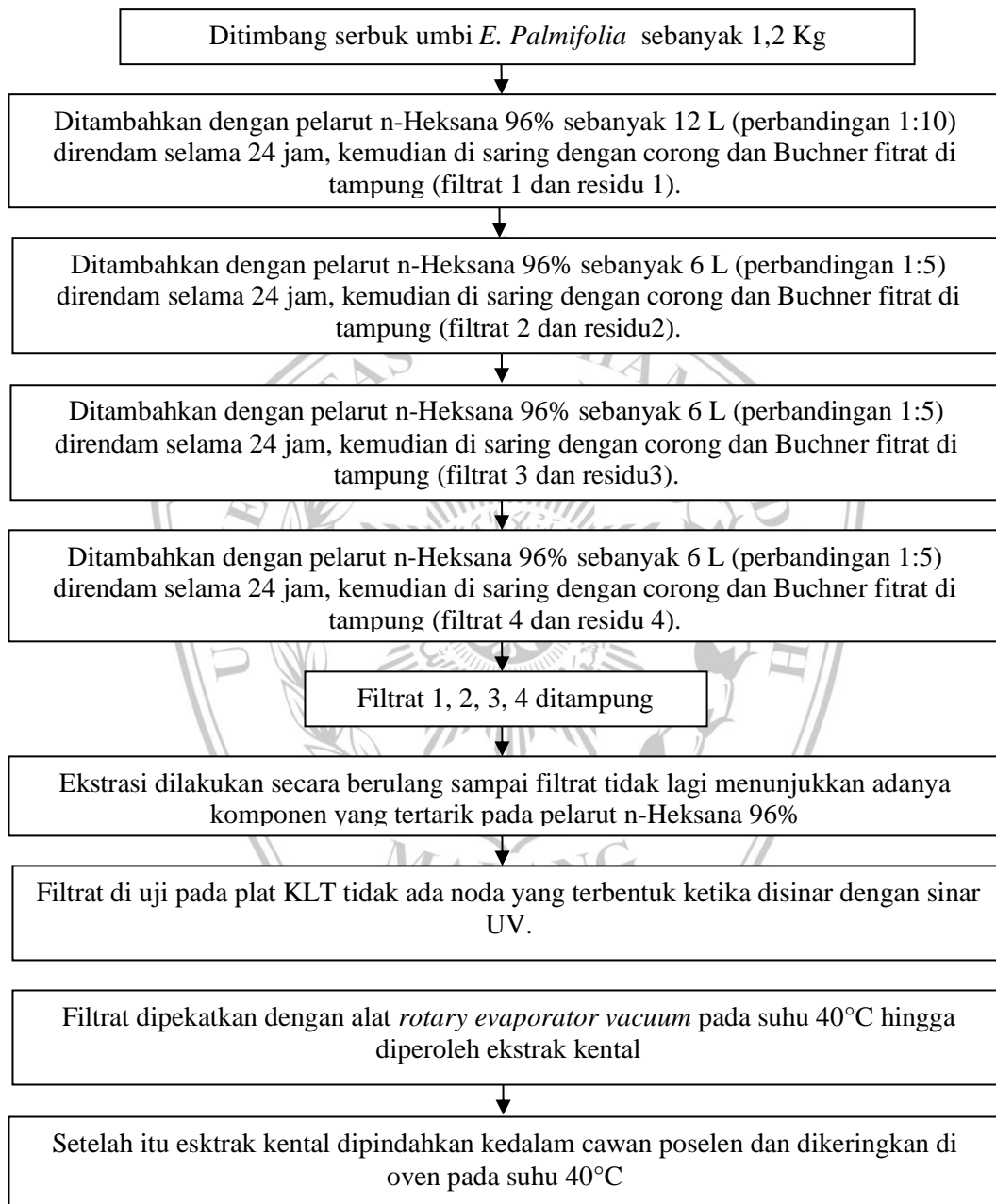
1. Persiapan simplisia
2. Penarikan komponen senyawa/Ekstraksi
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT

4. Pengujian antijamur dengan metode difusi cakram.

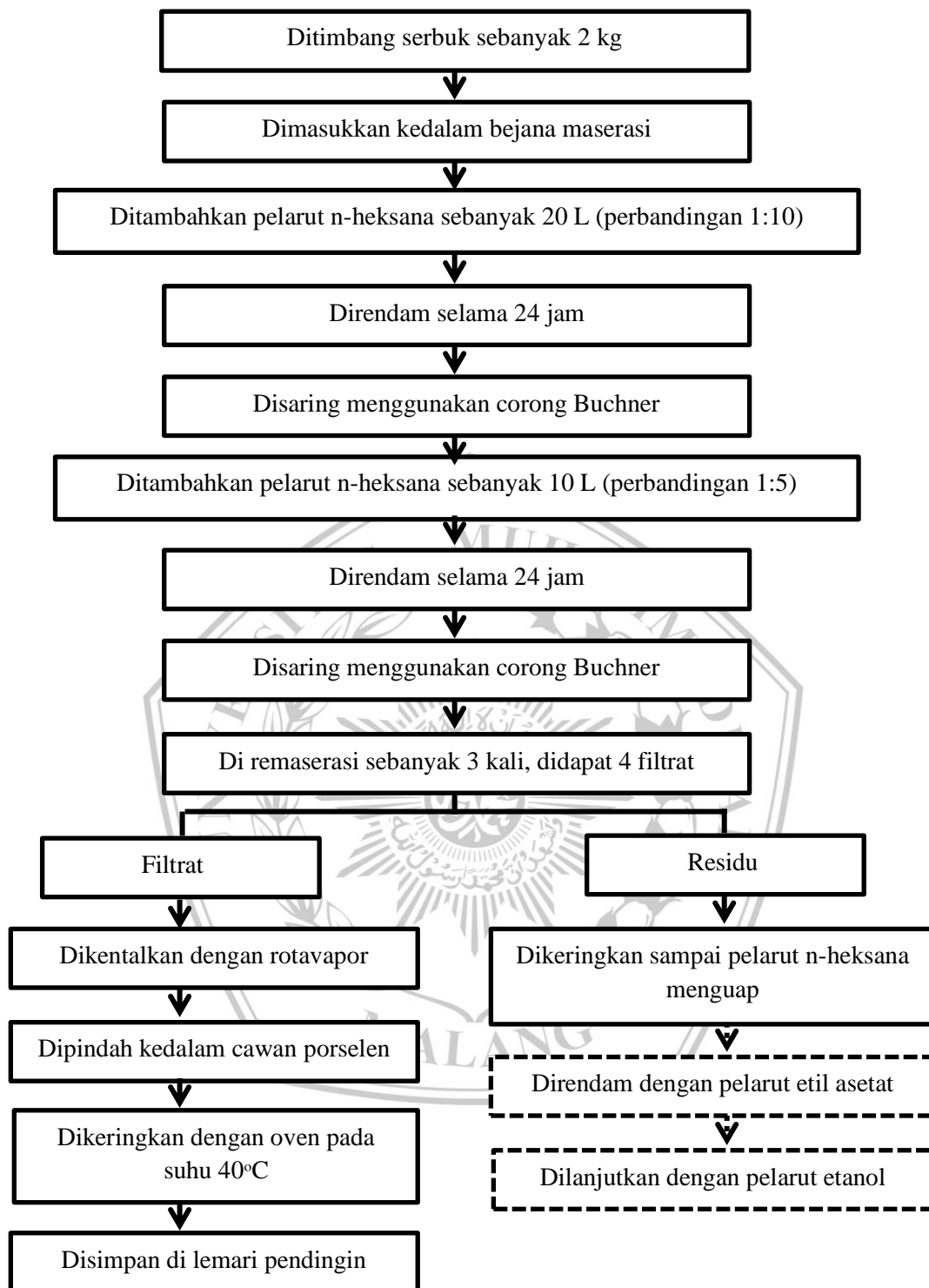
#### 4.7.2 Kerangka Operasional

Adapun langkah kerja yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

##### 4.7.2.1 Pembuatan Fraksi n-Heksana

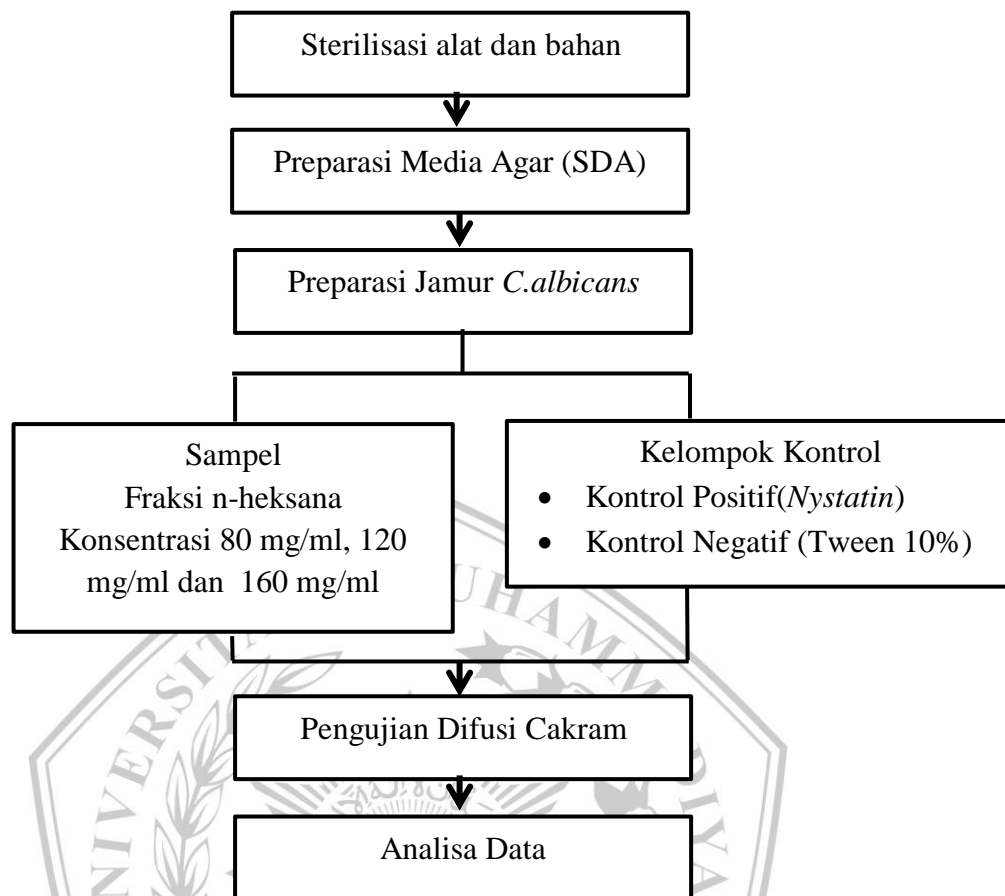


**Gambar 4. 1** Bagan Alir Proses Ekstraksi Bahan Uji Dengan Pelarut n-Heksana Sesi Pertama



**Gambar 4. 2** Bagan Alir Proses Ekstraksi Bahan Uji Dengan Pelarut n-Heksana Sesi kedua

#### 4.7.2.2 Persiapan Uji Jamur



**Gambar 4. 3** Bagan Alir Uji Aktivitas Antijamur

### 4.8 Prosedur Kerja

Adapun proses kerja yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

#### 4.8.1 Pembuatan Simplisia

Sampel yang diteliti adalah umbi *E. palmifolia* L. Umbi dibersihkan, ditiriskan, diiris tipis-tipis dan ditimbang, kemudian dikeringkan. Pengeringan pada suhu ruang dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggilingan, sehingga diperoleh serbuk halus. Selanjutnya diayak menggunakan *Shieve Shaker* dengan derajat kehalusan tertentu (Depkes, 2008).



Kemudian dilakukan pengukuran MC untuk mengetahui kadar air yang masih terdapat dalam ekstrak dengan memasukkan 2 gram ekstrak kering ke dalam alat MC, tekan *enter* pada alat hingga alat berbunyi.(replikasi 3 kali).

#### **4.8.2 Prosedur Kerja**

Adapun prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

##### **4.8.2.1 Pembuatan Ekstrak Bahan Uji**

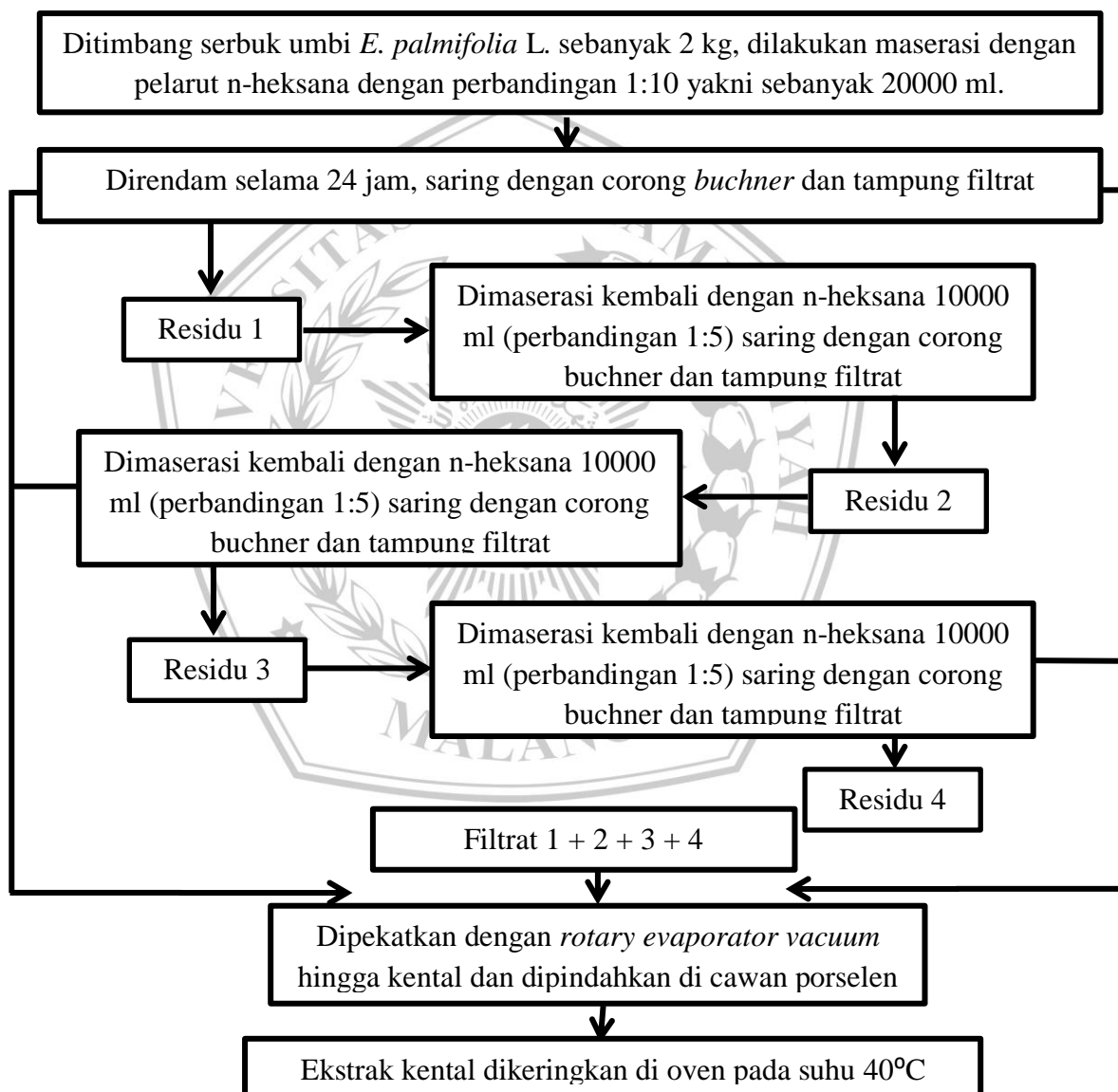
Pembuatan ekstrak bahan uji diadopsi dari penelitian yang dilakukan Ririn Puspawati et.al., (2017) dan Fiqrah Rezeki Amanda (2014) yang kemudian dikembangkan. Pada proses ekstraksi yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan 3 macam pelarut yaitu pelarut n-Heksana, etil asetat dan etanol 96%. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut :

Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk umbi *E. palmifolia* L. sebanyak 2 kilogram dan diekstraksi dengan menggunakan maserasi perendaman 24 jam sebagai berikut :

1. Timbang serbuk halus serbuk umbi *E. palmifolia* L. sebanyak 2 kilogram, masukkan ke dalam sebuah bejana bermulut besar.
2. Tambahkan pelarut n-Heksana sebanyak 20000 ml (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam, kemudian saring dengan corong buchner didapatkan filtrat 1 dan residu 1.
3. Residu 1 dimaserasi kembali dengan pelarut sebanyak 10000 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan di dapat filtrat 2 dan residu 2.
4. Residu 2 dimaserasi kembali dengan pelarut sebanyak 10000 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan didapat filtrat 3 dan residu 3.
5. Residu 3 dimaserasi kembali dengan pelarut sebanyak 10000 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan didapat filtrat 4 dan residu 4.
6. Dilakukan penotolan KLT masing-masing filtrat sebanyak 5 µl untuk melihat kepekatan dari filtrat yang didapatkan yang ditandai dengan tidak adanya noda yang terbentuk pada plat KLT.

7. Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45° C sampai diperoleh larutan ekstrak kental. Kemudian pindahkan ekstrak kental ke cawan porselen.
8. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C dan disimpan pada lemari pendingin.

Konsentrasi yang digunakan untuk penelitian ini adalah 80 mg/ml ; 120 mg/ml ; 160 mg/ml aktivitas antijamur umbi *E. palmifolia* L. pada konsentrasi tersebut cukup baik.



**Gambar 4. 4** Bagan Alir Proses Pembuatan Fraksi n-Heksana Umbi *E.palmifolia*

#### 4.8.2.2 Pemisahan Senyawa dengan KLT

Fraksi n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. ditimbang sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 1 ml n-Heksana pada wadah tertutup rapat. Totolkan sebanyak 5 µl pada lempeng KLT, kemudian di eluasi dengan berbagai macam fase gerak. Eluen yang memiliki kemampuan terbaik dalam memisahkan komponen senyawa, akan digunakan pada pengujian aktivitas antijamur dengan metode difusi cakram (Depkes, 2008).

- (1) Fase diam : Silika Gel TLC 60 F<sub>254</sub>
- (2) Fase gerak : n-Heksana : etil asetat ( 8: 2 )

#### 4.8.2.3 Identifikasi Komponen Senyawa

Terhadap komponen senyawa yang telah dipisahkan dengan metode KLT, dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi n-Heksana dengan penampak noda sebagai berikut:

- a) Alkaloid : dragendorff (noda berwarna jingga)
- b) Terpenoid : anisaldehyda-asam sulfat. Panaskan lempeng pada suhu 100° C selama 5-10 menit (noda berwarna ungu)
- c) Flavonoid : uap amonia atau asam sulfat 10% (noda berwarna kuning intensif)
- d) Polifenol : besi (III) klorida 1% (noda berwarna hitam)
- e) Antrakuinon : larutan kalium hidroksida 10% dalam etanol (noda berwarna jingga atau merah)

#### 4.8.2.4 Pembuatan Konsetrasi Larutan Uji

Pembuatan variasi konsentrasi larutan uji dibuat sebagai berikut :

- a) Ditimbang fraksi kental n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. sebanyak 80 mg, kemudian ditambahkan Tween 10 %, dilakukan dengan cara dilarutkan dalam 0,1 ml Tween, ditambahkan aquadest steril sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji 80 mg/ml.
- b) Ditimbang fraksi kental n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. sebanyak 120 mg, kemudian ditambahkan Tween 10 %, dilakukan dengan cara dilarutkan dalam 0,1 ml Tween, ditambahkan aquadest steril sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji 120 mg/ml.

- c) Ditimbang fraksi kental n-Heksana umbi *E. palmifolia* L. sebanyak 160 mg, kemudian ditambahkan Tween 10%, dilakukan dengan cara dilarutkan dalam 0,1 ml Tween, ditambahkan aquadest steril sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji 160 mg/ml.

#### 4.8.2.5 Pembuatan Media

Dalam penelitian ini digunakan dua media yakni *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB).

##### a. Pembuatan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan Mensuspensikan 65 gram medium dalam satu liter air destilata, kemudian direbus selama 1 menit. Setelah itu di tempatkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 ° C selama 15 menit. Dinginkan hingga 45 hingga 50 ° C dan tuang ke masing-masing cawan petri pada ruangan LAF (Rijal, 2015).

##### b. Pembuatan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)

Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) yaitu dengan mencampurkan 30 gram medium dengan satu liter aqua destilata ke dalam labu Erlenmeyer. Kemudian diaduk sampai homogen, dipanaskan selama 1 menit sampai homogen. Sterilisasi alat dan bahan dalam autoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit lalu disimpan pada suhu 2-8 °C, setelah itu larutan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) dituang 1 ml ke dalam masing-masing tabung untuk tiap konsentrasi kemudian dalam tabung lain dituangkan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) sebanyak 9 ml untuk pengenceran jamur di ruangan LAF (HiMedia Laboratories, 2015).

#### 4.8.2.6 Pembuatan Standar Mc Farland

Diambil 1 ose dari kultur stok jamur, dimasukkan ke dalam 2 ml media CYG kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian hasil dari inkubasi diambil 200 µl dimasukan ke dalam 2 ml media CYG dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-4 jam. Diencerkan dengan menggunakan NaCl 0,9%

sehingga mempunyai tingkat kekeruhan sesuai dengan standar Mc Farland (Konsentrasi jamur  $10^8$  CFU/ml). Dari suspensi yang memiliki angka kekeruhan  $10^8$  CFU/ml kemudian diambil 100  $\mu$ l suspensi dan dimasukkan ke dalam 9 ml CYG sehingga diperoleh angka  $10^6$  CFU/ml (Fajar, 2015).

**Tabel IV. 1** Tabel Standar Kekeruhan menurut Mc. Farland

TABLE 1. Number of yeast cells per ml of the 0.5 McFarland suspensions of 10 different species of yeasts<sup>a</sup>

Species	CFU/ml <sup>b</sup>	Cells/field <sup>c</sup>
<i>T. mucoides</i>	$4.5 \times 10^6$	<1
<i>Rhodotorula</i> spp.	$1.9 \times 10^6$	4-5
<i>C. tropicalis</i>	$3.3 \times 10^6$	5-6
<i>S. cerevisiae</i>	$1.2 \times 10^6$	<1
<i>C. parapsilosis</i>	$1.3 \times 10^6$	4-5
<i>C. glabrata</i>	$4.3 \times 10^6$	>20
<i>C. albicans</i>	$1.4 \times 10^6$	<1
<i>C. kefir</i>	$2.1 \times 10^6$	>10
<i>C. krusei</i>	$3.1 \times 10^6$	2-3
<i>T. inkin</i>	$1.4 \times 10^6$	<1

<sup>a</sup> One isolate each of the species listed was used to prepare a 0.5 McFarland suspension.

<sup>b</sup> CFU present in the 0.5 McFarland suspension that was further incubated in the Bactec bottles. Counts were determined using a Neubauer chamber and microscopy ( $\times 40$ ).

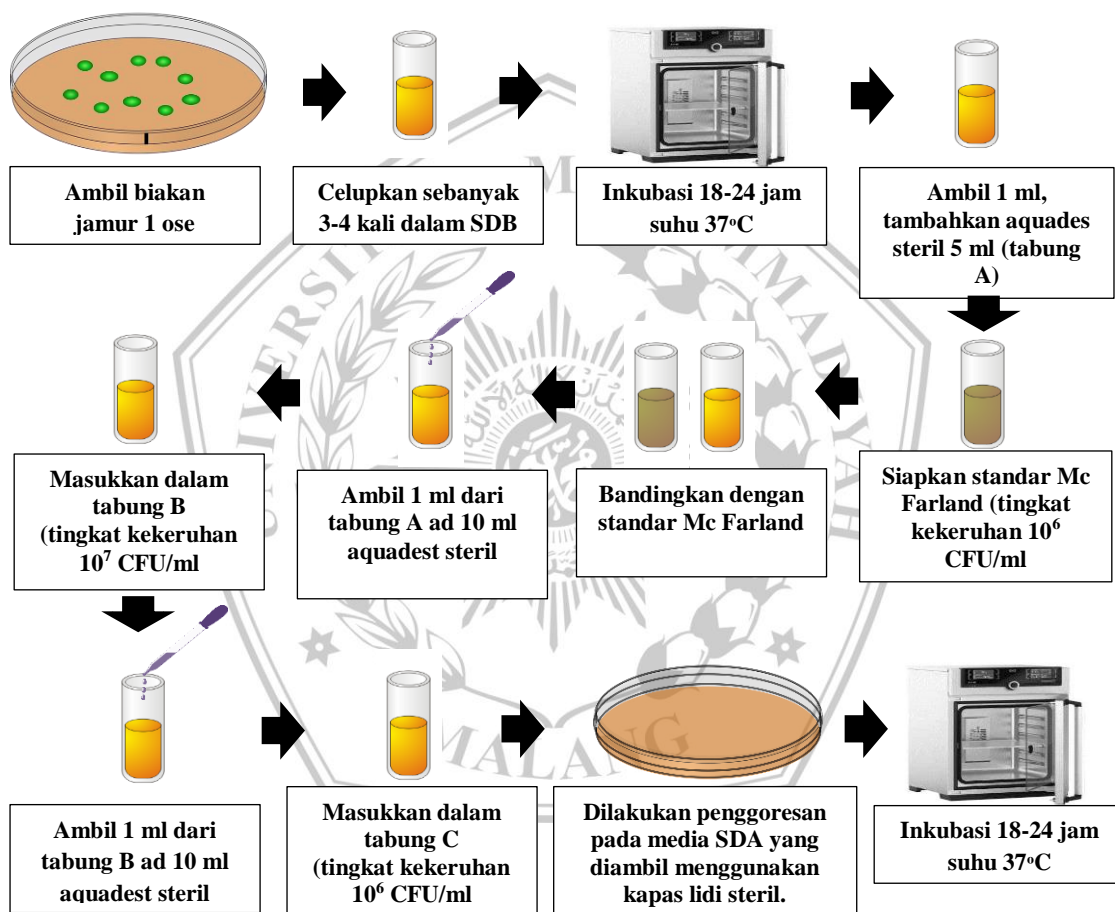
<sup>c</sup> A 0.5-ml sample of each suspension was inoculated in the Bactec bottle and further incubated. When the result was positive, we prepared a Gram stain of each bottle. Using microscopy ( $\times 100$ ), we counted the number of cells in 10 different fields and divided it by 10.

(Sumber : Guinea et.al., 2010).

#### 4.8.2.7 Preparasi Jamur

Proses peremajaan jamur diperoleh dari biakan murni sebanyak satu ose yang dicelupkan kedalam tabung sebanyak 3-4 kali yang berisi media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB), kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sebelum membuat suspensi jamur, standar McFarland disiapkan terlebih dahulu dengan tingkat kekeruhan  $10^6$  CFU/ml. Namun pada penelitian ini, dikarenakan biakan jamur sudah lebih dari 2 hari, maka tingkat kekeruhan digunakan  $10^7$  CFU/ml yang sama halnya setara dengan  $10^6$  CFU/ml. Kemudian dilakukan pembuatan suspensi jamur dengan teknik dilusi (pengenceran). Jamur uji diambil dari hasil peremajaan menggunakan pipet dan dimasukkan kedalam 5 ml aquadest steril (tabung A), dikocok atau aduk lalu dibandingkan dengan standar McFarland  $10^6$  CFU/ml. Jika kekeruhan sudah sama maka dapat dilakukan pengenceran hingga didapatkan jumlah koloni jamur yang diinginkan yaitu  $10^6$  CFU/ml. Pengenceran

dilakukan dengan mengambil 1 ml dari tabung A kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml (tabung B) dan didapat jumlah koloni  $10^7$  CFU/ml, kemudian diambil 1 ml dari tabung B dan dilarutkan dengan aquadest sampai 10 ml (tabung C) dan didapat koloni  $10^6$  CFU/ml. Kemudian dari tabung C dilakukan penggoresan pada media SDA yang diambil menggunakan kapas lidi steril dan digoreskan dengan 3-4 bagian secara horizontal, lalu putar cawan 90°. Lanjutkan goresan sampai merata. Setelah selesai, jamur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



**Gambar 4. 5** Skema Preparasi Jamur

#### 4.8.2.8 Pewarnaan Jamur Uji

Perwarnaan jamur uji yang dilakukan adalah pewarnaan jamur *C.albicans* dengan menggunakan pewarna LPCB. Perwarnaan jamur dilakukan untuk identifikasi dan untuk memastikan tidak ada kontaminan pada kultur kerja. Objek kaca yang digunakan dibersihkan dengan alkohol 96% dan dikeringkan. Kemudian tambahkan LPCB (*Lactophenol Cotton Blue*) 1 tetes di atas objek kaca, difiksasi

dengan api bunsen (lewatkan di atas api 2-3 kali). Kemudian ambil biakan jamur yang akan dilakukan pewarnaan dengan ose steril (biakan jamur yang diambil 1 koloni), Kemudian Periksa dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10), lalu diamati secara fisik bentuk dari *C.albicans* tersebut seperti adanya budding, hifa, maupun pseudohifa (Sherman, 2013).

#### **4.8.3 Tahap Pengujian**

Adapun tahap pengujian yang dilakukan dalam penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

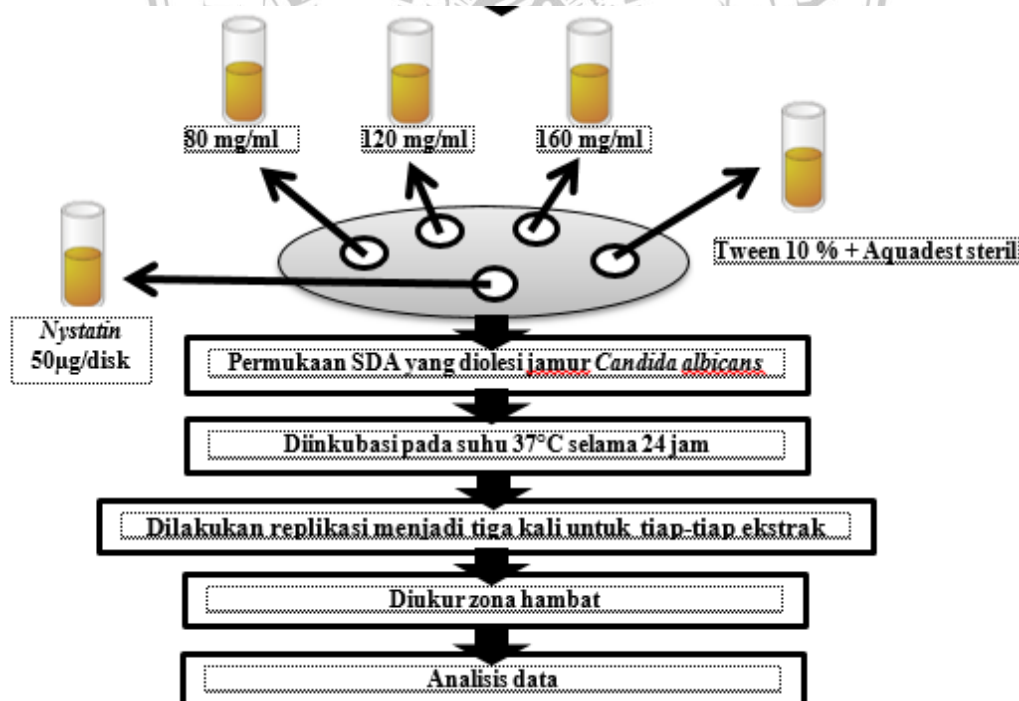
##### **4.8.3.1 Pengujian Penghambatan Pertumbuhan Jamur Dengan Difusi**

###### **Cakram**

Prosedur pengujian jamur *C.albicans* secara difusi cakram dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai berikut :

- 1) Disiapkan larutan uji masing-masing yang telah dimasukkan ke dalam eppendrop dengan konsentrasi yaitu 80 mg/ml (konsentrasi 1); 120 mg/ml (konsentrasi 2); dan 160 mg/ml (konsentrasi 3), kontrol positif (*Nistatin* 50 µg) dan kontrol negatif (Tween 10%)
- 2) Dilakukan peremajaan jamur dan preparasi media sehari sebelumnya.
- 3) Disiapkan larutan uji di pipet 10 µl dengan konsentrasi yang telah ditentukan (konsentrasi 1,2, dan 3) kemudian disk cakram kosong diletakkan di atas kaca arloji yang telah berisi kombinasi larutan uji kemudian diinkubasi selama 10 menit dengan pengulangan 5 kali dan dikeringkan dengan oven suhu 37°C selama 10 menit tiap setelah penetesan (sampai rendaman ke-5). Selesai perendaman ke-5 diletakkan di dalam LAF selama 1 jam. Sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan Tween 10% dengan perlakuan sama dengan larutan uji dan di oven suhu 37°C selama 10 menit.
- 4) Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

- 5) Hasil peremajaan jamur dilakukan cek pewarnaan jamur. Kemudian jamur yang telah di preparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu diletakkan pada tepi tabung reaksi, kemudian kapas lidi steril tersebut diputar agar jamur yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Setelah itu di oleskan pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) di cawan petri kemudian diratakan.
- 6) Kertas cakram yang telah berisi dosis larutan uji diletakkan diatas permukaan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Agar diperoleh kontak yang baik, kertas cakram dapat ditekan dengan lembut menggunakan pinset pada permukaannya. Jarak satu kertas cakram dengan kertas cakram yang lainnya diatur sedemikian rupa sehingga berjauhan.
- 7) Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 8) Pengujian senyawa antijamur dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya diameter zona (area) bening disekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong dalam satuan militer (mm).





**Gambar 4. 6** Bagan Alir Pengujian Penghambatan Pertumbuhan Jamur Dengan Metode Difusi Cakram

#### 4.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melakukan pengamatan terhadap pengukuran diameter zona hambat daerah berwarna bening dari masing-masing konsentrasi ekstrak umbi *E. palmifolia* L. terhadap jamur *C.albicans* yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). Dirumuskan sebagai berikut :

